

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



542991

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
5. August 2004 (05.08.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 2004/064855 A1

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: A61K 38/17, A61P 35/00

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2004/000362

(22) Internationales Anmeldedatum:  
19. Januar 2004 (19.01.2004)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
103 02 422.0 21. Januar 2003 (21.01.2003) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von  
US): RESPONSIF GMBH [DE/DE]; Schallershofer Str.  
84, 91056 Erlangen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BERTLING, Wolf  
[DE/DE]; Meisenweg 22, 91058 Erlangen (DE).

(74) Anwalt: GASSNER, Wolfgang; Nägelsbachstr. 49A,  
91052 Erlangen (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für  
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,  
AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,  
CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES,  
FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,  
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,  
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG,  
PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM,  
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM,  
ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für  
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,  
GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,  
ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,  
TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,  
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT,  
RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,  
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

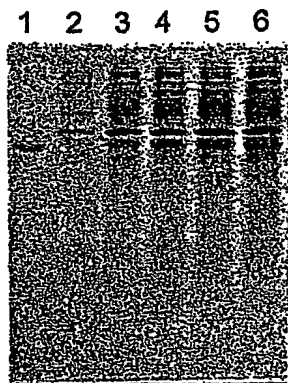
Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: MEDICAMENT AND USE THEREOF FOR TUMOR THERAPY

(54) Bezeichnung: MEDIKAMENT UND VERWENDUNG ZUR TUMORTHERAPIE



A Spur 1: cAnxV als Referenz  
B Spur 2: Zelllysat nach 4 h Wachstum  
C Spur 3: Zelllysat nach 6 h Wachstum  
D Spur 4: Zelllysat nach 7 h Wachstum  
E Spur 5: Zelllysat nach 8 h Wachstum  
F Spur 6: Zelllysat nach 16 h Wachstum

A ...TRACE 1: CANXV AS A REFERENCE  
B ...TRACE 2: CELL LYSATE AFTER 4 HOURS OF GROWTH  
C ...TRACE 3: CELL LYSATE AFTER 6 HOURS OF GROWTH  
D ...TRACE 4: CELL LYSATE AFTER 7 HOURS OF GROWTH  
E ...TRACE 5: CELL LYSATE AFTER 8 HOURS OF GROWTH  
F ...TRACE 6: CELL LYSATE AFTER 16 HOURS OF GROWTH

(57) Abstract: The invention relates to a medicament for tumor therapy, containing a first and a second molecule in an effective concentration, the first molecule representing a1) Annexin V or a molecule that is largely similar thereto, or a2) an effective fragment of Annexin V or the molecule that is largely similar thereto, and the second molecule representing b1) a cytokine or a molecule that is largely similar thereto, or b2) an effective fragment of a cytokine or the molecule that is largely similar thereto.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Medikament zur Tumorthherapie, bei dem in einer wirksamen Konzentration ein erstes und ein zweites Molekül enthalten sind, wobei das erste Molekül a1) Annexin V oder ein damit weit gehend ähnliches Molekül, oder a2) ein wirksames Fragment von Annexin V oder des damit weit gehend ähnlichen Moleküls ist, und wobei das zweite Molekül b1) ein Cytokin oder ein damit weit gehend ähnliches Molekül oder b2) ein wirksames Fragment eines Cytokins oder des damit weit gehend ähnlichen Moleküls ist.

WO 2004/064855 A1



— vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

**Medikament und Verwendung zur Tumorthherapie**

Die Erfindung betrifft ein Medikament und eine Verwendung zur  
5 Tumorthherapie.

Aus der DE 195 41 284 A1 ist es bekannt, dass Annexin V sich  
zur Therapie von Tumoren eignet. Das wird darauf zurückge-  
führt, dass durch die Gabe von Annexin V die Phosphatidylse-  
10 rin abhängige Phagozytose beeinflussbar ist.

Nach dem Stand der Technik ist kein Medikament bekannt, dass  
eine wirksame Tumorthherapie gewährleistet.

15 Aufgabe der Erfindung ist es, die Nachteile nach dem Stand  
der Technik zu beseitigen. Es sollen insbesondere ein Medi-  
kament und eine Verwendung zur Tumorthherapie angegeben wer-  
den.

20 Diese Aufgabe wird durch die Merkmale der Ansprüche 1 und 15  
gelöst. Zweckmäßige Ausgestaltungen der Erfindungen ergeben  
sich aus den Merkmalen der Ansprüche 2 bis 14 und 16 bis 30.

Nach Maßgabe der Erfindung wird ein Medikament zur Tumorthe-  
25 rapie vorgeschlagen, bei dem in einer wirksamen Konzentration  
ein erstes und ein zweites Molekül enthalten sind, wobei das  
erste Molekül

a1) Annexin V oder ein damit weit gehend ähnliches Molekül,  
30  
oder

a2) ein wirksames Fragment von Annexin V oder des damit weit  
gehend ähnlichen Moleküls ist,

35

**BESTÄTIGUNGSKOPIE**

und wobei das zweite Molekül

b1) ein Cytokin oder ein damit weit gehend ähnliches Molekül

5 oder

b2) ein wirksames Fragment eines Cytokin oder des damit weit gehend ähnlichen Moleküls ist.

10 Es hat sich überraschenderweise gezeigt, dass eine kombinierte Verabreichung von Annexin V bzw. gleichwirkender ähnlicher Moleküle und eines Cytokins oder eines damit gleichwirkenden ähnlichen Moleküls sich hervorragend zur Therapie von Tumoren eignet. Es wird innerhalb kurzer Zeit, z. B. innerhalb weniger Tage, eine Verringerung der Tumormasse bis hin zum völligen Verschwinden des Tumors beobachtet.

Das vorgeschlagene Medikament ist auch dann noch wirksam, wenn das erste Molekül lediglich ein mit Annexin V oder dem Cytokin ähnliches Molekül oder ein wirksames Fragment von Annexin V bzw. dem Cytokin oder ein mit dem Fragment weit gehend ähnliches Molekül umfasst. - Ein Fragment ist insbesondere dann "wirksam", wenn es in Kombination mit dem jeweils anderen Molekül ein Abschmelzen eines behandelten Tumors bewirkt. Unter dem Begriff "ähnliche Moleküle" werden solche Moleküle verstanden, welche zu einem gewissen Grad eine Identität mit Annexin V bzw. dem Cytokin aufweisen und in Kombination mit dem jeweils anderen Molekül wirksam sind.

30 Unter dem Begriff "Cytokin" wird ein Protein verstanden, das von einer Zelle freigesetzt wird und das Verhalten anderer Zellen beeinflusst.

Nach einer Ausgestaltung kann eine Aminosäuresequenz des ersten Moleküls der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 1 oder Nr.

2 entsprechen oder zumindest zu 50%, vorzugsweise zumindest zu 60%, besonders bevorzugt zumindest zu 70%, ganz besonders bevorzugt zumindest zu 80%, identisch damit sein. Die Ermittlung der Identität kann erfolgen z.B. nach dem Verfahren von  
5 Altschul, S. F. et al. (1997), Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

Unter dem Begriff "Identität" wird vorliegend das Ausmaß verstanden, zu welchem zwei Nukleotid- oder Aminosäuresequenzen  
10 invariant sind.

Bei der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 2 handelt es sich um eine N-terminale Deletionsmutante der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 1, der die acht Aminosäuren 3 bis 10, das heißt  
15 die Aminosäuren Lys Tyr Thr Arg Gly Thr Val Thr fehlen.

Zweckmäßigerweise ist das Annexin V nicht-humanes Annexin V, vorzugsweise das Annexin V des Huhns. Ein Vergleich der Aminosäuresequenz des Annexin V des Huhns mit menschlichem Annexin V ergibt, dass beide Proteine zu 78,2 % identisch sind.  
20 Das Annexin V des Huhnes besitzt einen theoretischen isoelektrischen Punkt (pI) von 5,60, während menschliches Annexin V einen theoretischen isoelektrischen Punkt von 4,94 aufweist. Die Sequenz des menschlichen Annexins kann unter der Zugriffsnummer PO8756 in der Protein Datenbank "SWISS-PROT" abgerufen werden.  
25

Das Cytokin kann aus der folgenden Gruppe ausgewählt sein: Interleukin-2, Interleukin-6, Interleukin-7, Interleukin-12, GM-CSF, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ .  
30

Es hat sich als besonders wirkungsvoll erwiesen, dass in einer Verabreichung 0,05 bis 0,5 mg/g Tumorgewicht an erstem Molekül in einer Verabreichungseinheit enthalten sind. Dabei kann eine Verabreichungseinheit 0,1 bis 2,5 mg, vorzugsweise 0,5 bis  
35

2,0 mg, an erstem Molekül enthalten. Sie enthält vorzugsweise ferner 50.000 bis 1.000.000 International Units, vorzugsweise 300.000 bis 750.000 International Units an zweitem Molekül. Ferner sind das erste und das zweite Molekül zweckmäßigerweise in einer Injektionsflüssigkeit, vorzugsweise einer gepufferten Kochsalzlösung, aufgenommen. Das Volumen der Injektionsflüssigkeit kann 0,5 bis 50 ml, vorzugsweise 1 bis 10 ml, betragen.

Das Medikament kann neben dem Wirkstoff weiterhin menschliche Tumorzellen umfassen, wobei die Tumorzellen apoptotische und/oder nekrotische Tumorzellen sein können. Die Apoptose und/oder Nekrose der Tumorzellen kann dabei spontan aufgetreten oder induziert worden sein. Als Induktoren für die Apoptose und/oder Nekrose kommen Bestrahlung der Tumorzellen ex-vivo oder in-vivo oder ein Inkontaktbringen der Tumorzellen mit Zytostatika in Betracht. Es eignen sich in diesem Zusammenhang insbesondere Chemikalien wie  $H_2O_2$  oder Staurosporin, Medikamente wie Kortikosteroide, Chemotherapeutika wie Doxorubicin, cis-Platin oder Hydroxy-Harnstoff, UVB- und UVC-Strahlung, sowie  $\beta$ -,  $\gamma$ - oder Röntgenstrahlung. Vorzugsweise werden die apoptotischen und/oder nekrotischen Tumorzellen des zu behandelnden Tumors mit dem Wirkstoff in Kontakt gebracht.

Nach weiterer Maßgabe der Erfindung ist eine Verwendung eines ersten Moleküls, nämlich

a1) Annexin V oder eines damit weit gehend ähnlichen Moleküls,

oder

a2) eines wirksamen Fragments von Annexin V oder eines damit weit gehend ähnlichen Moleküls,

in Kombination mit einem zweiten Molekül, nämlich

b1) Interleukin-2 oder einem damit weit gehend ähnlichen Mo-  
lekül

oder

b2) einem wirksamen Fragment von Interleukin-2 oder des da-  
mit weit gehend ähnlichen Moleküls,

zur Tumorthherapie vorgesehen.

Als besonders wirkungsvoll hat sich die Verwendung zur Be-  
handlung von Tumorergüssen erwiesen. Bei dem Tumor kann es  
sich insbesondere um ein Mammakarzinom handeln.

Wegen der vorteilhaften Ausgestaltungen wird auf die vorher-  
gehende Beschreibung verwiesen. Die darin erwähnten Merkmale  
können sinngemäß auch Ausgestaltungen des Medikaments sein.

Die Erfindung wird nachstehend anhand der Zeichnungen bei-  
spielhaft näher erläutert. Es zeigen:

Fig. 1 die Expressionskinetik von Annexin V des Huhns in  
transformierten Escherichia Coli BL21 (DE3) anhand  
einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese und

Fig. 2 eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proben der  
einzelnen Reinigungsschritte von Annexin V des  
Huhns aus transformierten Escherichia Coli BL21  
(DE3).

A. Expression und Reinigung von Annexin V des Huhns

## 1. Expression von Annexin V des Huhns

Für die Expression von Annexin V des Huhns (cAnxV) wurde als Expressionsplasmid pDJ2-AnxV verwendet, dass neben dem cAnxV kodierenden Gen einen IPTG-induzierbaren tac-Promotor und eine Kanamycin-Resistenz-Kassette enthält. E. coli BL21 (DE3) wurde mit dem Expressionsplasmid transformiert und Expressionskinetiken durchgeführt. Dabei wurde 2xYT mit 50 mg/l Kanamycin als Nährmedium eingesetzt.

Für die Herstellung von cAnxV wurde eine 100 ml Vorkultur mit frisch transformierten E. coli BL21 (DE3) angeimpft und 8 h bei 37°C geschüttelt. 5 l Hauptkultur wurden mit 5 ml der Vorkultur versetzt und 16 bis 20 h bei 37°C geschüttelt. Auf einen Zusatz von IPTG wurde verzichtet, da in diesem Fall mit und ohne Induktion gleiche Expressionsausbeuten erzielt wurden. Die Zellen wurden anschließend durch Zentrifugation geerntet. Die Zellfeuchtmasse betrug 16 bis 21 g. Die Expressionskinetik ist in Fig. 1 dargestellt. Die Expressionskinetiken ergaben, dass sich E. coli BL21 (DE3) auch ohne Induktion mit IPTG für eine Expression von cAnxV in dem eingesetzten Medium eignet.

## 2. Reinigung von Annexin V des Huhns

Die gemäß Ziff. 1 erhaltenen Zellen wurden in einem Puffer A1 (20 mM Tris/HCl pH 7,5, 2 mM EDTA) resuspendiert und mittels Hochdruck (Gaulin) aufgeschlossen. Unlösliche Bestandteile der Aufschlusssuspension wurden durch hochtourige Zentrifugation entfernt. Der lösliche cAnxV-enthaltende Überstand wurde auf eine in Puffer A1 äquilibrierte Q-Sepharose-ff-Säule (Säule 1) (25 ml, amersham pharmacia, Freiburg) aufgetragen. Die Elution des Zielproteins erfolgte durch einen linearen NaCl-Gradienten. Die cAnxV-enthaltenden Fraktionen wurden gepoolt und gegen einen Puffer A2 (50 mM Na-Acetat pH 5,6) dia-



lysiert. Das Dialysat wurde auf eine in A2 äquilibrierte Resource-S-Säule (Säule 2) (6 ml, amersham pharmacia, Freiburg) aufgetragen und cAnxV mit einem linearen NaCl-Gradienten eluiert. Die vereinigten cAnxV-enthaltenden Fraktionen wurden  
5 mittels Ultrafiltration (Pall Filtron, USA) konzentriert und auf eine in 10 mM Na-Phosphat pH 7,2, 140 mM NaCl äquilibrierte Superdex 200 pg-Säule (Säule 3) (amersham pharmacia, Freiburg) aufgetragen. Homogenes cAnxV wurde von der Säule eluiert. Aus 20 g Zellen (Feuchtmasse) wurden 30 mg cAnxV mit  
10 einer Reinheit, die 95 % überstieg, isoliert. Fig. 2 zeigt anhand einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese die Ergebnisse der Reinigung unter Verwendung der Säulen 1 bis 3.

Alternativ kann anstelle der angegebenen Säulen für Säule 1  
15 Q-Sepharose XL (amersham pharmacia, Freiburg), für Säule 2 SP-Sepharose HP (amersham pharmacia, Freiburg) und/oder für Säule 3 Sephacryl S200 HR (amersham pharmacia, Freiburg) verwendet werden.

20 Alternativ kann anstelle der mittels Säule 3 durchgeführten Größen-Ausschluss-Chromatografie (SEC) eine hydrophobe Säule eingesetzt werden. In diesem Fall werden die cAnxV-enthaltenden Fraktionen, die von Säule 2 eluieren, vereinigt und mit festem Ammoniumsulfat auf 1,5 M aufgestockt. Die Protein-  
25 lösung wird auf eine Phenylsepharose ff-Säule (15 ml, amersham pharmacia, Freiburg) aufgetragen und cAnxV mit einem linearen Gradienten von 1,5 bis 0 M Ammoniumsulfat eluiert.

#### B. Tumorthherapie

30

Einem Patienten wurden in einem individuellen Heilversuch in 1 ml gepufferter Kochsalzlösung aufgenommenes Annexin V gemäß Sequenzprotokoll SEQ ID NO: 1 zusammen mit 500.000 International Units Interleukin-2 in ein etwa 2 cm großes Melanom

injiziert. Es zeigt sich bereits nach wenigen Tagen ein deutliches Abschmelzen des Melanoms.

Nach einem weiteren Therapieverfahren ist es auch möglich, zunächst dem Patienten Tumorzellen zu entnehmen. Die entnommenen Tumorzellen werden mechanisch dissoziiert; es wird die Zellenzahl bestimmt. Anschließend werden die Zellen mit 100 Gray bestrahlt, so dass die Tumorzellen in apoptotische oder nekrotische Tumorzellen überführt werden.  $10 \times 10^6$  der apoptotischen oder nekrotischen Tumorzellen werden anschließend mit einer gepufferten Kochsalzlösung gemischt, die 1 mg Annexin V gemäß Sequenzprotokoll SEQ.1 oder SEQ.2 enthält. Es erfolgt anschließend eine Inkubation. Unmittelbar vor der Injektion werden 500.000 International Units Interleukin-2 hinzugefügt. Die die apoptotischen Tumorzellen, Annexin V und Interleukin-2 enthaltende Mischung wird dann dem Patienten intradermal oder subkutan injiziert. Auch dabei wird bereits nach wenigen Tagen ein signifikantes Abschmelzen des behandelten Tumors beobachtet.

Zur Steigerung der Effizienz des vorgenannten Therapieverfahrens und zur Bekämpfung eines Rezidivs kann die Injektion z. B. am Tag 21, 42 und an späteren Tagen oder in der zweiten, dritten und sechsten Woche wiederholt werden.

Zum Nachweis der besonderen Wirksamkeit einer kombinierten Verabreichung von Cytokin und Annexin V werden die Überstände von peritonealen Makrophagen sowie von aus Knochenmark gewonnenen dendritischen Zellen jeweils für 24 Stunden mit einem Medium inkubiert. Abschließend werden jeweils die Mengen (in pg/ml) an freigesetzten Cytokinen, nämlich TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , mittels ELISA ermittelt. Die Versuche werden unter identischen Bedingungen wiederholt, wobei das Medium zusammen mit bestrahlten Tumorzellen (ITC), mit Annexin V (AxV) sowie mit bestrahlten Tumorzellen und Annexin V inkubiert wird. Bei der

Co-Inkubation hat das Verhältnis von ITC:Phagozyten 5:1 betragen. Die erhaltenen Ergebnisse sind nachdem Students t Test ausgewertet worden, wobei  $* = p < 0,01$ ;  $** = p < 0,005$ .

- 5 In der nachfolgende Tabelle sind die gewonnenen Ergebnisse vergleichend dargestellt.

Cytokin (pg/ml)	Makrophagen				Dendritische Zellen			
	Medium		Medium + AxV		Medium		Medium + AxV	
	/	ITC	/	ITC	/	ITC	/	ITC
TNF- $\alpha$	125 $\pm$ 15	335 $\pm$ 30	117 $\pm$ 24	978 $\pm$ 48**	267 $\pm$ 137	392 $\pm$ 79	245 $\pm$ 121	426 $\pm$ 78
IL-1 $\beta$	21 $\pm$ 5	44 $\pm$ 7	14 $\pm$ 1	322 $\pm$ 85*	10 $\pm$ 4	46 $\pm$ 4	8 $\pm$ 3	47 $\pm$ 3

\*  $P < 0.05$

\*\*  $P < 0.01$

10

Wie aus den Ergebnissen deutlich hervorgeht, ist nach Co-Inkubation mit bestrahlten Tumorzellen die Sezernierung postinflammatorischer Cytokine, nämlich TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , durch Makrophagen deutlich erhöht. Bei einer Co-Inkubation von Makro-

15 phagen mit bestrahlten und mit Annexin V behandelten Tumorzellen wird dieser Effekt drastisch verstärkt.

## Patentansprüche

1. Medikament zur Tumorthherapie, bei dem in einer wirksamen  
Konzentration ein erstes und ein zweites Molekül enthalten  
5 sind, wobei das erste Molekül

a1) Annexin V oder ein damit weit gehend ähnliches Molekül,

oder

a2) ein wirksames Fragment von Annexin V oder des damit weit  
gehend ähnlichen Moleküls ist,

und wobei das zweite Molekül

b1) ein Cytokin oder ein damit weit gehend ähnliches Molekül

oder

b2) ein wirksames Fragment eines Cytokins oder des damit  
weit gehend ähnlichen Moleküls ist.

2. Medikament nach Anspruch 1, wobei die Aminosäuresequenz  
des ersten Moleküls der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 1  
25 oder Nr. 2 entspricht oder zumindest zu 50%, vorzugsweise zu-  
mindest zu 60%, besonders bevorzugt zu zumindest 70%, ganz  
besonders bevorzugt zumindest zu 80%, identisch damit ist.

3. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wo-  
30 bei das Annexin V nicht-humanes Annexin V ist.

4. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wo-  
bei das nicht-humane Annexin V das Annexin V des Huhns ist.

5. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Cytokin aus der folgenden Gruppe ausgewählt ist: Interleukin-2, Interleukin-6, Interleukin-7, Interleukin-12, GM-CSF, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ .

5

6. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei 0,05 bis 0,5 mg/g<sub>Tumorgewicht</sub> an erstem Molekül in einer Verabreichungseinheit enthalten sind.

10 7. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei eine Verabreichungseinheit 0,1 bis 2,5 mg, vorzugsweise 0,5 bis 2,0 mg, an erstem Molekül enthält.

15 8. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei eine Verabreichungseinheit 50.000 bis 1.000.000 International Units, vorzugsweise 300.000 bis 750.000 International Units, an zweitem Molekül enthält.

20 9. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das erste und das zweite Molekül in einer Injektionsflüssigkeit, vorzugsweise einer gepufferten Kochsalzlösung, aufgenommen sind.

25 10. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Volumen der Injektionsflüssigkeit 0,5 bis 50 ml, vorzugsweise 1 bis 10 ml, beträgt.

30 11. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei es apoptotische und/oder nekrotische Tumorzellen umfasst.

12. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei es weiterhin menschliche Tumorzellen umfasst.

13. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Tumorzellen apoptotische und/oder nekrotische Tumorzellen des zu behandelnden Tumors sind.

5 14. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Tumorzellen mit dem Protein in Kontakt sind.

15. Verwendung eines ersten Moleküls, nämlich

10 a1) Annexin V oder eines damit weit gehend ähnlichen Moleküls

oder

15 a2) eines wirksamen Fragments von Annexin V oder des damit weit gehend ähnlichen Moleküls,

in Kombination mit einem zweiten Molekül, nämlich

20 b1) einem Cytokin oder einem damit weit gehend ähnlichen Molekül

oder

25 b2) einem wirksamen Fragment eines Cytokins oder des damit weit gehend ähnlichen Moleküls,

zur Tumorthherapie.

30 16. Verwendung nach Anspruch 15, wobei der Tumor ein Tumorigeruss ist.

17. Verwendung nach Anspruch 15 oder 16, wobei der Tumor ein Mammakarzinom ist.

18. Verwendung nach einem der Ansprüche 15 bis 17, wobei die Aminosäuresequenz des ersten Moleküls der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 1 oder Nr. 2 entspricht oder zumindest zu 50%, vorzugsweise zumindest zu 60%, besonders bevorzugt zu zumindest 70%, ganz besonders bevorzugt zumindest zu 80%, identisch damit ist.

19. Verwendung nach einem der Ansprüche 15 bis 18, wobei das Annexin V nicht-humanes Annexin V ist.

20. Verwendung nach einem der Ansprüche 15 bis 19, wobei das nicht-humane Annexin V das Annexin V des Huhns ist.

21. Verwendung nach einem der Ansprüche 15 bis 20, wobei das Cytokin aus der folgenden Gruppe ausgewählt ist: Interleukin-2, Interleukin-6, Interleukin-7, Interleukin-12, GM-CSF, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ .

22. Verwendung nach einem der Ansprüche 15 bis 21, wobei 0,05 bis 0,5 mg/g<sub>Tumorgewicht</sub> an erstem Molekül V in einer Verabreichungseinheit enthalten ist.

23. Verwendung nach einem der Ansprüche 15 bis 22, wobei eine Verabreichungseinheit 0,1 bis 2,5 mg, vorzugsweise 0,5 bis 2,0 mg, an erstem Molekül enthält.

24. Verwendung nach einem der Ansprüche 15 bis 23, wobei eine Verabreichungseinheit 50.000 bis 1.000.000 International Units, vorzugsweise 300.000 bis 750.000 International Units, an zweitem Molekül enthält.

25. Verwendung nach einem der Ansprüche 15 bis 24, wobei das erste und das zweite Molekül in einer Injektionsflüssigkeit, vorzugsweise einer gepufferten Kochsalzlösung, aufgenommen sind.

26. Verwendung nach einem der Ansprüche 15 bis 25, wobei das Volumen der Injektionsflüssigkeit 0,5 bis 50 ml, vorzugsweise 1 bis 10 ml, beträgt.

5

27. Verwendung nach einem der Ansprüche 15 bis 26, wobei es apoptotische und/oder nekrotische Tumorzellen umfasst.

28. Verwendung nach einem der Ansprüche 15 bis 27, wobei es  
10 weiterhin menschliche Tumorzellen umfasst.

29. Verwendung nach einem der Ansprüche 15 bis 28, wobei die Tumorzellen apoptotische und/oder nekrotische Tumorzellen des zu behandelnden Tumors sind.

15

30. Verwendung nach einem der Ansprüche 15 bis 29, wobei die Tumorzellen mit dem Protein in Kontakt sind.



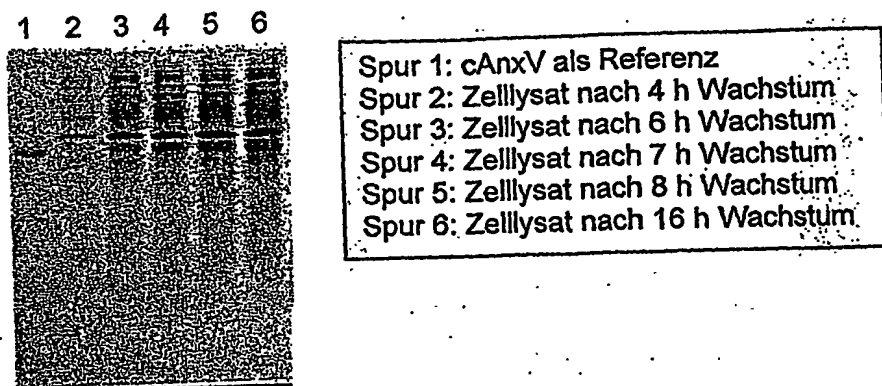


Fig. 1

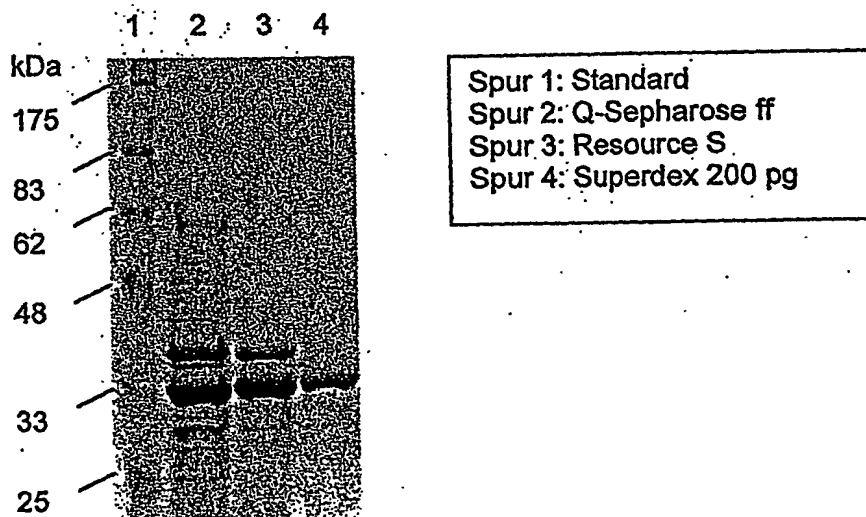


Fig. 2

## SEQUENZPROTOKOLL

&lt;110&gt; november Aktiengesellschaft Gesellschaft für Molekulare Medizin

5 &lt;120&gt; Medikament und Verwendung zur Tumorthherapie

&lt;130&gt; 411814GA

&lt;140&gt;

10 &lt;141&gt;

&lt;160&gt; 2

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

15

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 321

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Gallus gallus

20

&lt;300&gt;

&lt;400&gt; 1

25 Met Ala Lys Tyr Thr Arg Gly Thr Val Thr Ala Phe Ser Pro Phe Asp  
1 5 10 15Ala Arg Ala Asp Ala Glu Ala Leu Arg Lys Ala Met Lys Gly Met Gly  
20 25 3030 Thr Asp Glu Glu Thr Ile Leu Lys Ile Leu Thr Ser Arg Asn Asn Ala  
35 40 45Gln Arg Gln Glu Ile Ala Ser Ala Phe Lys Thr Leu Phe Gly Arg Asp  
50 55 6035 Leu Val Asp Asp Leu Lys Ser Glu Leu Thr Gly Lys Phe Glu Thr Leu  
65 70 75 8040 Met Val Ser Leu Met Arg Pro Ala Arg Ile Phe Asp Ala His Ala Leu  
85 90 95Lys His Ala Ile Lys Gly Ala Gly Thr Asn Glu Lys Val Leu Thr Glu  
100 105 11045 Ile Leu Ala Ser Arg Thr Pro Ala Glu Val Gln Asn Ile Lys Gln Val  
115 120 125Tyr Met Gln Glu Tyr Glu Ala Asn Leu Glu Asp Lys Ile Thr Gly Glu  
130 135 14050 Thr Ser Gly His Phe Gln Arg Leu Leu Val Val Leu Leu Gln Ala Asn  
145 150 155 16055 Arg Asp Pro Asp Gly Arg Val Asp Glu Ala Leu Val Glu Lys Asp Ala  
165 170 175Gln Val Leu Phe Arg Ala Gly Glu Leu Lys Trp Gly Thr Asp Glu Glu  
180 185 19060 Thr Phe Ile Thr Ile Leu Gly Thr Arg Ser Val Ser His Leu Arg Arg  
195 200 205

Val Phe Asp Lys Tyr Met Thr Ile Ser Gly Phe Gln Ile Glu Glu Thr  
 210 215 220  
 5 Ile Asp Arg Glu Thr Ser Gly Asp Leu Glu Lys Leu Leu Leu Ala Val  
 225 230 235 240  
 Val Lys Cys Ile Arg Ser Val Pro Ala Tyr Phe Ala Glu Thr Leu Tyr  
 245 250 255  
 10 Tyr Ser Met Lys Gly Ala Gly Thr Asp Asp Asp Thr Leu Ile Arg Val  
 260 265 270  
 15 Met Val Ser Arg Ser Glu Ile Asp Leu Leu Asp Ile Arg His Glu Phe  
 275 280 285  
 Arg Lys Asn Phe Ala Lys Ser Leu Tyr Gln Met Ile Gln Lys Asp Thr  
 290 295 300  
 20 Ser Gly Asp Tyr Arg Lys Ala Leu Leu Leu Leu Cys Gly Gly Asp Asp  
 305 310 315 320  
 Glu  
 25  
 <210> 2  
 <211> 313  
 <212> PRT  
 30 <213> Gallus gallus  
 <400> 2  
 Met Ala Ala Phe Ser Pro Phe Asp Ala Arg Ala Asp Ala Glu Ala Leu  
 1 5 10 15  
 35 Arg Lys Ala Met Lys Gly Met Gly Thr Asp Glu Glu Thr Ile Leu Lys  
 20 25 30  
 40 Ile Leu Thr Ser Arg Asn Asn Ala Gln Arg Gln Glu Ile Ala Ser Ala  
 35 40 45  
 Phe Lys Thr Leu Phe Gly Arg Asp Leu Val Asp Asp Leu Lys Ser Glu  
 50 55 60  
 45 Leu Thr Gly Lys Phe Glu Thr Leu Met Val Ser Leu Met Arg Pro Ala  
 65 70 75 80  
 Arg Ile Phe Asp Ala His Ala Leu Lys His Ala Ile Lys Gly Ala Gly  
 85 90 95  
 50 Thr Asn Glu Lys Val Leu Thr Glu Ile Leu Ala Ser Arg Thr Pro Ala  
 100 105 110  
 Glu Val Gln Asn Ile Lys Gln Val Tyr Met Gln Glu Tyr Glu Ala Asn  
 115 120 125  
 55 Leu Glu Asp Lys Ile Thr Gly Glu Thr Ser Gly His Phe Gln Arg Leu  
 130 135 140  
 60 Leu Val Val Leu Leu Gln Ala Asn Arg Asp Pro Asp Gly Arg Val Asp  
 145 150 155 160

	Glu	Ala	Leu	Val	Glu 165	Lys	Asp	Ala	Gln	Val 170	Leu	Phe	Arg	Ala	Gly 175	Glu
5	Leu	Lys	Trp	Gly 180	Thr	Asp	Glu	Glu	Thr 185	Phe	Ile	Thr	Ile	Leu 190	Gly	Thr
	Arg	Ser	Val 195	Ser	His	Leu	Arg	Arg 200	Val	Phe	Asp	Lys	Tyr 205	Met	Thr	Ile
10	Ser	Gly 210	Phe	Gln	Ile	Glu	Glu 215	Thr	Ile	Asp	Arg	Glu 220	Thr	Ser	Gly	Asp
15	Leu 225	Glu	Lys	Leu	Leu	Leu 230	Ala	Val	Val	Lys	Cys 235	Ile	Arg	Ser	Val	Pro 240
	Ala	Tyr	Phe	Ala 245	Glu	Thr	Leu	Tyr	Tyr	Ser 250	Met	Lys	Gly	Ala	Gly 255	Thr
20	Asp	Asp	Asp	Thr 260	Leu	Ile	Arg	Val	Met 265	Val	Ser	Arg	Ser	Glu 270	Ile	Asp
	Leu	Leu	Asp 275	Ile	Arg	His	Glu	Phe 280	Arg	Lys	Asn	Phe	Ala 285	Lys	Ser	Leu
25	Tyr	Gln 290	Met	Ile	Gln	Lys	Asp 295	Thr	Ser	Gly	Asp	Tyr 300	Arg	Lys	Ala	Leu
30	Leu 305	Leu	Leu	Cys	Gly 310	Gly	Asp	Asp	Glu							

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP2004/000362

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
IPC 7 A61K38/17 A61P35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DE 195 41 284 A (KALDEN JOACHIM ROBERT PROF DR) 30 May 1996 (1996-05-30) cited in the application column 5, lines 1-22, 31-36 column 4, lines 26-37	1-30
A	US 2002/192162 A1 (GREEN ALLAN M) 19 December 2002 (2002-12-19) claim 54	1-30

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

14 July 2004

Date of mailing of the international search report

21/07/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Ludwig, G

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP2004/000362

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE 19541284	A	30-05-1996	DE 19541284 A1	30-05-1996
			AT 245995 T	15-08-2003
			CA 2236888 A1	15-05-1997
			DE 59610633 D1	04-09-2003
			WO 9717084 A1	15-05-1997
			EP 1356818 A2	29-10-2003
			EP 0859628 A1	26-08-1998
			ES 2205065 T3	01-05-2004
			JP 2000500124 T	11-01-2000
			US 2004096467 A1	20-05-2004
US 2002192162	A1	19-12-2002	US 2003202939 A1	30-10-2003
			CA 2442382 A1	17-10-2002
			EP 1372740 A2	02-01-2004
			WO 02080754 A2	17-10-2002

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP2004/000362

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 7 A61K38/17 A61P35/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
IPK 7 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	DE 195 41 284 A (KALDEN JOACHIM ROBERT PROF DR) 30. Mai 1996 (1996-05-30) in der Anmeldung erwähnt Spalte 5, Zeilen 1-22,31-36 Spalte 4, Zeilen 26-37	1-30
A	US 2002/192162 A1 (GREEN ALLAN M) 19. Dezember 2002 (2002-12-19) Anspruch 54	1-30

☐ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*&\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

14. Juli 2004

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

21/07/2004

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Ludwig, G

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

**PCT/EP2004/000362**

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
DE 19541284	A	30-05-1996	DE	19541284 A1	30-05-1996
			AT	245995 T	15-08-2003
			CA	2236888 A1	15-05-1997
			DE	59610633 D1	04-09-2003
			WO	9717084 A1	15-05-1997
			EP	1356818 A2	29-10-2003
			EP	0859628 A1	26-08-1998
			ES	2205065 T3	01-05-2004
			JP	2000500124 T	11-01-2000
			US	2004096467 A1	20-05-2004
US 2002192162	A1	19-12-2002	US	2003202939 A1	30-10-2003
			CA	2442382 A1	17-10-2002
			EP	1372740 A2	02-01-2004
			WO	02080754 A2	17-10-2002